



**Universidad
Zaragoza**



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado Biotechnología

Toxicidad *in vitro* de compuestos bactericidas con potencialidad terapéutica frente a *Helicobacter pylori*: Estudio preliminar

*In vitro toxicity of bactericidal compounds with therapeutic
potential against Helicobacter pylori: Preliminary study*

Autora

Alicia Carazo García

Directores

Andrés González Rodríguez

Elena Piazuolo Ortega

Ponente

Ángel Lanas Arbeloa

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. <i>Helicobacter pylori</i>	4
2.1.1. Prevalencia	4
2.1.2. Manifestaciones clínicas.....	4
2.1.3. Microbiología.....	5
2.1.4. Factores de virulencia.....	5
2.2. Tratamiento de la infección por <i>H. pylori</i>	6
2.2.1. Resistencia a antibióticos	6
2.2.2. Nuevas dianas terapéuticas: HsrA.....	7
3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1. Compuestos.....	10
4.2. Líneas celulares	10
4.2.1. Línea celular HeLa.....	10
4.2.2. Línea celular Caco-2/TC7	10
4.2.3. Almacenamiento y descongelación de las líneas celulares.....	11
4.2.4. Mantenimiento de los cultivos celulares	11
4.2.5. Conteo y determinación de la densidad celular.....	12
4.3. Ensayos de toxicidad <i>in vitro</i>	12
4.3.1. Ensayo de reducción de la resazurina: puesta a punto.....	12
4.3.2. Evaluación de la toxicidad intrínseca del DMSO	14
4.3.3. Ensayos de toxicidad de los compuestos de interés	15
4.3.4. Concentración citotóxica media (CC50) e índice terapéutico (IT).....	15
4.3.5. Análisis estadístico	15
5. RESULTADOS.....	16
5.1. Puesta a punto del ensayo de reducción de la resazurina.....	16
5.2. Evaluación de la de toxicidad intrínseca del DMSO (vehículo)	16
5.3. Citotoxicidad de los inhibidores I, V, VIII y XII de HsrA en células HeLa.....	18
5.3.1. Compuesto I	18
5.3.2. Compuesto V	18
5.3.3. Compuesto VIII	19
5.3.4. Compuesto XII	20
5.3.5. Concentración citotóxica media (CC50) de los compuestos de interés	20
5.4. Cálculo del índice terapéutico (IT).....	21

6.	DISCUSIÓN	21
7.	CONCLUSIONES	24
	CONCLUSIONS	25
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS	25
9.	REFERENCIAS	26

1. RESUMEN

La infección por *Helicobacter pylori* es una de las más frecuentes en todo el mundo. Actualmente, más de la mitad de la población mundial se encuentra infectada por dicha bacteria. Muchos casos son asintomáticos, sin embargo, en ocasiones pueden aparecer trastornos digestivos y, además, se ha asociado con la aparición de cáncer gástrico.

Existen varias terapias basadas en antibióticos eficaces contra *H. pylori* (terapias triple y cuádruple), sin embargo, la creciente tasa de resistencia a antibióticos está provocando la falta de éxito en muchos casos. Por tal motivo, es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos eficaces en el tratamiento. Previo a este estudio se identificaron una serie de compuestos de la quimioteca HitFinder con capacidad de inhibir la función de unión al DNA del regulador de respuesta HsrA de *H. pylori* y con potente actividad bactericida *in vitro* frente a cepas resistentes a los antibióticos de primera línea de tratamiento claritromicina y metronidazol. Consecuentemente, en el presente trabajo se propuso evaluar la toxicidad *in vitro* en dos líneas celulares humanas, HeLa y CaCo2/TC7, de cuatro de estos compuestos, y se calculó su índice terapéutico (IT).

Se puso a punto el ensayo de reducción de la resazurina para estimar la viabilidad celular utilizando el reactivo PrestoBlue y se llevaron a cabo los ensayos de citotoxicidad. Los resultados preliminares mostraron que los compuestos VIII y XII presentan una elevada toxicidad en células HeLa y un índice terapéutico muy bajo. La citotoxicidad del compuesto I es baja y su IT alto. Por contraposición, el efecto tóxico del compuesto V es el más bajo y su IT el más elevado con gran diferencia, incluso superior al del metronidazol. Por tanto, teniendo en cuenta su potente actividad bactericida, puede convertirse en un buen candidato para el tratamiento de la infección.

ABSTRACT

Helicobacter pylori infection is one of the most common infections in the world. Nowadays, more than a half of the world's population is infected with the bacterium. Many cases are asymptomatic, however, digestive disorders can sometimes appear in the human body. Moreover, the infection has been associated with the development of gastric cancer.

There are several antibiotic-based therapies effective against *H. pylori* (triple and quadruple therapies), however, the increasing rate of antibiotic resistance is leading to a lack of success in many cases. Consequently, the search for new effective drugs in treatment is necessary. Previous to this study, a series of compounds from the HitFinder chemical library were identified with the capacity to inhibit the DNA-binding function of the HsrA response regulator of *H. pylori*. These compounds also have a strong *in vitro* bactericidal activity against resistant strains to the first-line antibiotics clarithromycin and metronidazole. For this reason, in the present work we proposed to evaluate the *in vitro* toxicity of four of these compounds in two human cell lines, HeLa and Caco-2/TC7, as well as, calculate their therapeutic index (TI).

The resazurin reduction assay using Prestoblue reagent was set up in our cell model and cell viability assays were then performed. The preliminar results showed that compounds VIII and XII present high toxicity and an extremely low therapeutic index in HeLa cells. Cytotoxicity of compound I appeared low while its TI was presented high. As opposed, the compound V's toxic effect was the lowest of them all and its TI was showed as the highest by a far, even higher than the metronidazole's. Therefore, considering its powerful bactericidal activity, it could become a good candidate for the treatment of *H. pylori* infection.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la clase ϵ -proteobacteria, capaz de colonizar el epitelio gástrico humano provocando una variedad de trastornos gastrointestinales y extragástricos. Para ello, presenta la capacidad de adaptarse a las condiciones extremas de la mucosa gástrica y sobrevivir a su pH ácido. (1)

2.1.1. Prevalencia

La infección por *H. pylori* es una de las más comunes. Además, persiste toda la vida si no se erradica, por ello es importante conocer la epidemiología y la prevalencia con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias capaces de erradicar la infección y con ello las complicaciones gástricas que produce. (2)

Hay que tener en cuenta que la epidemiología ha ido cambiando con el curso de los años debido a las mejoras en el saneamiento y a los nuevos tratamientos. En la actualidad, más de la mitad de la población mundial se encuentra infectada con esta bacteria. También cabe destacar las grandes diferencias que se observan en la población afectada entre las diferentes regiones, las cuales se pueden asociar a las condiciones sociales y económicas de cada país, siendo la prevalencia inversamente proporcional al nivel socioeconómico. En países en desarrollo, las tasas de prevalencia pueden situarse cerca del 80%, mientras que en países desarrollados existe más variabilidad (3). Concretamente, la prevalencia más alta se da en África (79,1%), seguida de América Latina y el Caribe (63,4%) y Asia (54,7%), mientras que la más baja se encuentra en América del norte (37,1%) y Oceanía (24,4%). En cuanto a España, más de la mitad de la población presenta la infección (54,9%) (4).

Por otro lado, también se encuentran diferencias entre los distintos grupos étnicos dentro de una misma región, a pesar de estar expuestos a condiciones ambientales similares, así como diferencias entre distintas zonas en el patrón de manifestaciones clínicas, por ejemplo, África es la región con mayor prevalencia de infección, sin embargo, la incidencia de cáncer gástrico es menor que en otras como China y Japón (4). A pesar de todo, la prevalencia mundial está disminuyendo, en especial en los países desarrollados y en los niños, siendo las sociedades menos favorecidas económicamente por lo general, las que presentan las mayores tasas de infección. (5)

2.1.2. Manifestaciones clínicas

Aunque la mayoría de las personas infectadas son asintomáticas, la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* puede traer consigo una serie de trastornos gastrointestinales e incluso del tracto hepatobiliar (6). La infiltración de la bacteria en la mucosa produce en casi todos los casos la inflamación de la misma, lo que conlleva a gastritis tanto aguda como crónica. También se ha encontrado una fuerte relación con las úlceras pépticas, gástricas y duodenales, siendo esta bacteria la principal causa. Además, existen estudios que responsabilizan a *H. pylori* de la aparición de dispepsia no ulcerosa o funcional. (1)

En ocasiones, la inflamación crónica de la mucosa puede llevar a la destrucción de su estructura, se eliminan las glándulas gástricas y se pierde celularidad, es lo que se conoce como gastritis atrófica crónica. Esto puede traer consigo la sustitución de la mucosa por epitelio intestinal (metaplasia). Estos procesos ocurren en aproximadamente el 50% de las personas colonizadas con *H. pylori*. El siguiente paso es la displasia que en ocasiones resulta en adenocarcinoma gástrico.

Dependiendo de la gravedad de la atrofia, las zonas de metaplasia se extienden de manera multifocal y aumentan el riesgo de cáncer gástrico hasta 90 veces (1,7). Por otro lado, también existen estudios que sugieren una fuerte correlación entre la infección por *H. pylori* y el desarrollo de linfoma MALT gástrico, un tipo de linfoma de células B capaz de llegar al estómago gracias a las lesiones producidas en la mucosa por esta bacteria. Debido a esta asociación tan estrecha con el cáncer gástrico, *H. pylori* ha sido reconocida como agente carcinógeno de tipo I por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, *International Agency for Research of Cancer*). (8,9)

Por último, existen otras afecciones fuera del tracto gastrointestinal asociadas con *H. pylori* entre las que se encuentran la enfermedad de las arterias coronarias, anemia por deficiencia de hierro, enfermedad tiroidea autoinmune y trombocitopenia inmunitaria, entre otras. (1,6)

2.1.3. Microbiología

H. pylori es un bacilo Gram-negativo, con una longitud de 2-4 µm de largo y 0,5-1 µm de ancho. Su morfología es espiral, sin embargo, cuando se somete a largos periodos de cultivo *in vitro* o condiciones desfavorables puede adquirir forma cocoide. Tiene entre 2 y 6 flagelos unipolares que le permiten moverse por la capa de moco que recubre a las células epiteliales gástricas. (1,9,10)

En cuanto a su metabolismo, es respiratorio, puede oxidar la glucosa, pero ningún otro azúcar. Es una bacteria microaerófila, por lo que requiere un mínimo de oxígeno que utiliza como aceptor de electrones. Además, carece de algunas rutas de biosíntesis de aminoácidos por lo que solo podrá crecer en un medio químico definido que los incluya (arginina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina y valina). (1)

En cuanto a su cultivo, el requerimiento más importante es la microaerofilia con una atmósfera al 2-5% de oxígeno, 5-10% de CO₂ y una humedad alta (90-95%). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque es capaz de hacerlo en un rango de 34-40°C. Con respecto al pH, la bacteria es capaz de habitar en el pH ácido de la mucosa gástrica llegando a sobrevivir hasta en un pH de 4, sin embargo, su pH óptimo es de 7 y es capaz de crecer únicamente en el rango de 5,5 a 8 (1,11). La bacteria necesita medios de cultivo complejos, normalmente suplementados con sangre o suero. Los medios de cultivo sólidos más usados son el agar Columbia, el agar Mueller-Hinton y el agar sangre, suplementados con sangre completa de mamífero grande como caballo u oveja. En cuanto al cultivo en medio líquido se puede utilizar el caldo de *Brucella* o *Brain Heart Infusion*, suplementados con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS). (11)

2.1.4. Factores de virulencia

H. pylori cuenta con una serie de factores que favorecen la colonización de la mucosa gástrica y su resistencia al entorno ácido. El flagelo le permite avanzar en un medio viscoso como es la capa de moco y penetrar en ella donde las condiciones de pH son más cercanas a la neutralidad favoreciendo su crecimiento. Tiene 4 quimiorreceptores (genes *tlpA*, *B*, *C* y *D*), una CheA quinasa, un regulador de respuesta CheY y otra serie de proteínas fundamentales para la quimiotaxis. Las enzimas antioxidantes le permiten defenderse de las especies reactivas de oxígeno originadas durante la respuesta inflamatoria del huésped. La ureasa es fundamental en la defensa contra el pH ácido gracias a la producción de NH₄⁺ y para su correcto plegamiento, se requiere la unión de níquel a su chaperona. Por otro lado, la adhesión de la bacteria a las células del epitelio intestinal gástrico es otro factor fundamental, para ello cuenta con una serie de adhesinas específicas de receptor, una de las más estudiadas es BabA. (1,10)

También presenta una serie de factores de virulencia, entre los que se encuentran las toxinas codificadas por *vacA* y *cagA*, que se han relacionado con el daño de la mucosa gástrica y el desarrollo de úlceras y cáncer gástrico. *VacA* es una citotoxina que produce la vacuolización y posterior muerte de las células epiteliales. *CagA* es inyectada en la célula huésped por un sistema de secreción tipo 4 codificado en la región denominada *cagPAI* (isla de patogenicidad PAI), una vez dentro interacciona con una serie de dianas, de las cuales la más importante es la proteína SHP-2 de la que se ha demostrado su actividad oncogénica. De esta manera, se ha visto que un alto porcentaje de pacientes que desarrollan cáncer gástrico presentan infección por cepas que tienen los genes de estas toxinas. (7,10,12)

2.2. Tratamiento de la infección por *H. pylori*

Existe una amplia gama de antibióticos eficaces contra *H. pylori in vitro*, sin embargo, su uso *in vivo* está muy limitado como consecuencia del entorno ácido en el que habita la bacteria. Desde hace ya varios años, se demostró la necesidad de combinar distintos antimicrobianos y otros compuestos con el objetivo de conseguir una alta tasa de erradicación. Sin embargo, el tratamiento está evolucionando continuamente, y la terapia de primera línea en cada región dependerá principalmente de las tasas de resistencia de la bacteria a los antibióticos efectivos contra ella.

Hasta hace pocos años, la terapia triple era la más utilizada. En ella se combinan un inhibidor de la bomba de protones (IBP) con 2 antimicrobianos. En la terapia triple clásica se administra el inhibidor de la bomba de protones (IBP) junto con claritromicina y amoxicilina, durante 10-14 días. En su defecto, se puede sustituir la amoxicilina por metronidazol. Esta terapia deja de ser eficaz cuando la tasa de resistencia de *H. pylori* a claritromicina en la región es superior al 15%. (13,14)

En regiones donde la resistencia a claritromicina es alta (>15%) pero la resistencia a metronidazol es baja-intermedia el tratamiento de primera línea recomendado es la terapia cuádruple concomitante sin bismuto durante 14 días. En ella se administra un inhibidor de la bomba de protones, amoxicilina, claritromicina y metronidazol. Esta da buenos resultados en España (tasa de resistencia a claritromicina de 22,4%) donde se considera tratamiento de primera línea. (2,14)

En áreas donde existe alta resistencia a claritromicina y metronidazol al mismo tiempo (>15%) se está implementando la terapia cuádruple con bismuto, siendo el tratamiento de elección de primera línea. Se combina el bismuto con antibióticos para los cuales no existan problemas de resistencia, como amoxicilina, tetraciclina, furazolidona y rifabutina, e incluso con un inhibidor de la bomba de protones. En el caso de no disponer de bismuto se puede administrar una terapia cuádruple con levofloxacina, rifabutina, y altas dosis de IBP y amoxicilina (terapia dual). (14)

El bismuto presenta efecto bactericida y dificulta la adhesión de *H. pylori* a la mucosa gástrica. Además, protege la mucosa aumentando la secreción de prostaglandinas, bicarbonato y factor de crecimiento epidérmico (EGF). En cuanto a los inhibidores de la bomba de protones (IBP), estos disminuyen la secreción ácida del estómago al inhibir de manera irreversible a la enzima H/K-ATPasa presente en las células parietales de la mucosa gástrica. Existen gran variedad de IBP, algunos de ellos son: Esomeprazol, Omeprazol, Lansoprazol, Rabeprazol y Pantoprazol. (13,15)

2.2.1. Resistencia a antibióticos

La falta de éxito de la terapia viene determinada por diversidad de factores relacionados con el propio paciente, la cepa que infecta o incluso la dosis y duración del tratamiento (16). Sin embargo, la creciente tasa de resistencia a antibióticos de *H. pylori* sigue siendo la principal causa del fracaso de

las actuales terapias de erradicación. Tal es la gravedad, que en 2017 la bacteria fue incluida en la lista de patógenos prioritarios resistentes a antibióticos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (17). En una revisión del 2018 (18), se recogieron datos de la resistencia de *H. pylori* a distintos antibióticos en las regiones epidemiológicas de la OMS. Las prevalencias de la resistencia a claritromicina fueron de 18% en la Región Europea (EUR), 33% en la Región del Mediterráneo Oriental (EMR) y 34% en la Región del Pacífico Occidental (WPR). La resistencia a metronidazol fue mayor del 15% en todas las regiones de la OMS llegando al 56% en la EMR. En el caso de la levofloxacina, la prevalencia fue mayor al 15% en todas las regiones a excepción de la EUR donde representa un 11%.

La claritromicina pertenece a la familia de antibióticos macrólidos y su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis proteica al unirse al RNA ribosómico 23S de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano impidiendo de esta manera la actuación de la enzima peptidil transferasa. El principal mecanismo de resistencia de *H. pylori* a claritromicina se basa en mutaciones puntuales en el gen 23S del RNA ribosómico que afectan a la conformación del ribosoma impidiendo así la unión del antibiótico. Se ha visto que una de las más comunes es la mutación A2143G en dicho gen (19). El metronidazol es un nitroimidazol, se trata de un profármaco cuyo grupo nitro es reducido por proteínas de transporte electrónico, entre las que está implicada la nitrorreductasa codificada por el gen *rdxA*. Como consecuencia de la reducción, se forman radicales libres que dañan las estructuras celulares y el DNA (20). La mutación G47A del gen *rdxA* es una de las principales causas de la resistencia a metronidazol de la bacteria (19). En cuanto a la levofloxacina, esta pertenece al grupo de las fluoroquinolonas y actúa inhibiendo a la DNA girasa bacteriana, de manera que impide el correcto desarrollo de la replicación del DNA. Se ha visto que el principal mecanismo de resistencia a levofloxacina de *H. pylori* viene dado por mutaciones puntuales en los genes que codifican para las subunidades de esta enzima, siendo las más frecuentes aquellas que afectan al aspártico en posición 91 del gen *gyrA* (19).

2.2.2. Nuevas dianas terapéuticas: HsrA

Los altos niveles de resistencia frente a los antibióticos convencionales utilizados hasta el momento llevan a la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento. Ante esta situación, la utilización de nuevas dianas moleculares es una de las estrategias más prometedoras para el descubrimiento de nuevos antibióticos. El reto consiste en buscar compuestos dirigidos contra estas dianas y capaces de inhibir el crecimiento bacteriano sin afectar a la microbiota normal *in vivo*. En este contexto, se presenta al regulador de respuesta HsrA de *H. pylori* como una potencial diana terapéutica (21).

El gen HsrA codifica para un regulador de respuesta huérfano que pertenece a la familia OmpR y que ha demostrado ser esencial para el mantenimiento de la viabilidad celular, puesto que la interrupción del gen es letal para la bacteria (22). *In vivo* se presenta como un dímero constituido por dos dominios, un dominio N-terminal con función reguladora y un dominio C-terminal con función efectora y capacidad de unión al DNA. A diferencia de los clásicos sistemas reguladores de dos componentes bacterianos, en este caso no se ha encontrado una proteína con actividad histidina quinasa asociada y se ha demostrado que la actividad del regulador es independiente de fosforilación (23). En cuanto a su función biológica, se ha verificado su capacidad para unirse a la región promotora de un gen de una proteína de quimiotaxis que acepta metilo (gen *tlpB*), a su propio promotor lo que sugiere que se trata de un gen autorregulable y al promotor de un RNA regulador implicado en la motilidad y la adhesión a la célula huésped (gen *cncR1*). Además, se ha relacionado también con la regulación del estrés homeostático, la defensa frente al estrés oxidativo y el metabolismo del

nitrógeno. Cabe destacar que, los promotores regulados por HsrA se regulan coordinadamente con respecto a la fase de crecimiento, lo que sugiere que pueda regular funciones como la división celular, la metilación del DNA, la biosíntesis de la membrana y el flagelo, y la replicación cromosómica (24,25).

Una de las estrategias más novedosas para abordar el problema de la resistencia a antibióticos es el reposicionamiento de fármacos ya comercializados. Consiste en encontrar una nueva utilidad clínica para un fármaco que ya ha sido aprobado con otra finalidad terapéutica. Esto permite disminuir el tiempo y el coste que suponen el descubrimiento, desarrollo y aprobación de nuevos antibióticos. En este contexto, se examinó la capacidad de fármacos antihipertensivos 1,4-dihidropiridinas (DHP) para inhibir la función del regulador de respuesta HsrA y su acción antibacteriana *in vitro* e *in vivo*. Seis de ellos consiguieron inhibir la capacidad de unión al DNA de HsrA y presentaron actividad bactericida frente a cepas de *H. pylori* resistentes a claritromicina y metronidazol con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 4-32 mg/L. Estudios de eficacia preclínica realizados en ratones mostraron resultados prometedores para la Nimodipina y la Nitrendipina, puesto que producen una reducción significativa de la colonización gástrica por *H. pylori* tras la administración combinada de estos junto con Omeprazol (26).

De forma similar, en un estudio previo de nuestro grupo (21), se examinó la quimioteca Prestwick compuesta por una colección de 1120 moléculas pequeñas aprobadas por la FDA. De entre todos los compuestos, siete flavonoides naturales fueron capaces de unirse a HsrA inhibiendo su capacidad de unión al DNA *in vitro*. Además, cuatro de ellos (apigenina, crisina, kaempferol y hesperetina) mostraron una fuerte actividad bactericida frente a cepas de *H. pylori* resistentes a claritromicina y metronidazol.

En tal sentido, además del reposicionamiento, nuestro grupo trabajó en el desarrollo *de novo* de nuevos antimicrobianos frente a *H. pylori*. Se realizó el cribado masivo de la quimioteca HitFinder de la casa Maybridge (Thermo Fisher, Reino Unido), constituida por 10 000 compuestos de bajo peso molecular y naturaleza química diversa, no aprobados para un uso farmacológico. Para el cribado se utilizó el ensayo de desplazamiento de la temperatura media de desnaturalización (T_m), con el fin de identificar dentro de la quimioteca aquellos compuestos que interaccionaban con la proteína HsrA recombinante en su conformación nativa. Mediante este ensayo, aquellos compuestos de la quimioteca que se unen de forma específica en algún sitio de la estructura nativa de la proteína HsrA y forman un complejo estable proteína-ligando, determinarán un incremento de la estabilidad termodinámica del complejo, lo cual se traduce en un aumento significativo ($> 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) del valor experimental de la T_m de la proteína. Mediante este procedimiento se identificaron un total de 32 compuestos de bajo peso molecular que se unían a la proteína HsrA formando un complejo estable proteína-ligando. Estudios posteriores de retardo en gel (EMSA) permitieron demostrar que la unión de algunos de estos ligandos al regulador transcripcional HsrA afectaba sensiblemente a su actividad biológica, dado por una inhibición total de la unión del regulador a sus promotores diana a una concentración de al menos 2 mM de compuesto en el EMSA.

Dado que los resultados de estas investigaciones pueden ser susceptibles a protección bajo secreto de patente, a los 32 ligandos de HsrA provenientes de la quimioteca HitFinder les fue asociada una Identidad de Compuesto (ID), empleando números romanos consecutivos por orden decreciente del valor de la diferencia de temperatura media de desnaturalización (ΔT_m) entre el complejo proteína-compuesto y el valor de T_m de la proteína sola. En el presente trabajo, nos propusimos evaluar la toxicidad *in vitro* de algunos de los nuevos inhibidores de HsrA pertenecientes a la quimioteca HitFinder.

3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Se dispone de una colección de pequeñas moléculas de naturaleza química diversa provenientes de la quimioteca HitFinder, como se ha indicado anteriormente, que actúan como ligandos del regulador transcripcional esencial HsrA de *H. pylori*. Estos compuestos han demostrado capacidad para inhibir la función biológica de este regulador *in vitro*, impidiendo su unión al DNA. Además, algunos de ellos muestran una potente actividad bactericida frente a cepas de *H. pylori* resistentes a algunos antibióticos de primera línea, como claritromicina y metronidazol, sin causar daño importante en miembros representativos de la microbiota normal. Estas evidencias los sitúan como prometedores fármacos con actividad antimicrobiana frente a la infección por *H. pylori*. En el presente trabajo se evalúa la toxicidad *in vitro* de 4 inhibidores de HsrA con fuerte actividad bactericida frente a *H. pylori*, los compuestos I, V, VIII y XII.

En base a todo esto, el objetivo general de este trabajo de fin de grado ha sido avanzar en la identificación y caracterización de nuevos inhibidores con potencialidad terapéutica del regulador de respuesta HsrA de *H. pylori*. Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos:

1. Puesta a punto de una técnica para estimar la viabilidad celular en dos líneas celulares humanas, HeLa y Caco-2/TC7.
2. Evaluación *in vitro* de la toxicidad intrínseca del dimetilsulfóxido (DMSO).
3. Evaluación *in vitro* de la toxicidad de los inhibidores I, V, VIII y XII de HsrA en la línea de células HeLa.
4. Cálculo del índice terapéutico de los compuestos de interés.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Compuestos

Los compuestos utilizados en el estudio provienen de la quimioteca HitFinder de la casa Maybridge (Thermo Fisher, Reino Unido), como se ha indicado anteriormente. Son ligandos del regulador de respuesta HsrA capaces de inhibir su actividad *in vitro*. Además, estos compuestos han demostrado una potente actividad bactericida frente a cepas de *H. pylori* resistentes a algunos antibióticos convencionales utilizados para el tratamiento en la clínica, como claritromicina y metronidazol. En concreto, en el presente trabajo se evalúa la toxicidad *in vitro* de los compuestos asignados con los números romanos I, V, VIII y XII.

Estos compuestos se guardaron congelados en alícuotas a una concentración de 128 µg/mL que se fueron descongelando para su utilización. A la hora de trabajar con ellos es importante tener en cuenta que son fotosensibles por lo que se manipularon sin luz en la campana de flujo laminar.

4.2. Líneas celulares

Para la realización de los experimentos se utilizaron dos líneas de células humanas distintas como modelo experimental *in vitro*, la línea celular HeLa y la línea celular Caco-2/TC7. Ambas son líneas celulares adherentes cuyo crecimiento se produce en monocapa en las paredes del frasco.

4.2.1. Línea celular HeLa

La línea celular HeLa fue la primera línea celular humana establecida en cultivo y actualmente es una de las más usadas en investigación. Proviene del adenocarcinoma de cérvix de una paciente llamada Henrietta Lacks, de ahí el nombre de la línea celular, que murió de ese cáncer en 1951 y fueron cultivadas por su médico, George Otto Gey, del hospital Johns Hopkins. (27)

Las células para realizar los experimentos fueron cedidas por la Dra. Olga Abián Franco del Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI). Su cultivo se realizó en medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, Life Technologies), 1% de dipéptido L-alanina-L-glutamina (GlutaMAX, Thermo Fisher) y 1% de solución antibiótica penicilina-estreptomina (Sigma-Aldrich).

4.2.2. Línea celular Caco-2/TC7

La línea celular Caco-2 fue establecida en la década de 1970 a partir de un adenocarcinoma de colon humano por Jorgen Fogh en el *Sloan-Kettering Cancer Research Institute* (28). En este trabajo se utilizó el clon TC7 que deriva de la línea parental Caco-2, en concreto del pase 198, y que se diferencia de la línea original en que presenta una mayor tasa de crecimiento y un mayor grado de diferenciación hacia enterocito, tanto morfológico como funcional (29).

Una característica distintiva de la línea celular Caco-2 es que se mantiene indiferenciada durante la fase de crecimiento exponencial, sin embargo, al alcanzar la confluencia puede observarse cierta diferenciación espontánea, de manera que las células comienzan a adquirir características morfológicas y bioquímicas de los enterocitos que constituyen el borde en cepillo del intestino delgado. En monocapa comienzan a polarizarse adquiriendo en primer lugar el característico borde en cepillo apical, se forman uniones estrechas entre las células adyacentes y comienzan a expresar algunas enzimas típicas de los enterocitos (28). Esto contrasta con las HeLa que se mantienen indiferenciadas durante todo su cultivo, por lo que resulta interesante para la realización de los

estudios de toxicidad, puesto que permite comparar los resultados en dos modelos celulares con esta característica distinta.

Las células Caco-2/TC7 para realizar los experimentos fueron cedidas por el Profesor José Emilio Mesonero del Departamento de Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza. Su cultivo se realizó en medio DMEM suplementado con un 20% de suero fetal bovino (SFB, Life Technologies), 1% de dipéptido L-alanina-L-glutamina (GlutaMAX, Thermo Fisher), 1% de solución antibiótica penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich) y 1% de una solución de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich). El medio de cultivo de ambas líneas celulares se guardó en frío en la nevera.

4.2.3. Almacenamiento y descongelación de las líneas celulares

A partir de la alícuota que fue cedida, se expandieron las células de cada línea y se almacenaron congeladas en tanques de nitrógeno líquido en alícuotas de 2×10^6 células. Este paso es importante para evitar la acumulación de cambios genéticos y requiere de medios de congelación con criopreservantes que minimicen los daños, especialmente en la membrana celular, por la formación de cristales de hielo. En este caso se utiliza una solución de suero fetal bovino (SFB) suplementado con un 10% de DMSO y el descenso de la temperatura debe ser lento y uniforme. Para ello se colocan las células con la solución de congelación en un criovial y se introducen en un *cryocooler* que contiene isopropanol y permite el descenso de la temperatura hasta -80°C a razón de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Para su uso se descongelaron y se sembraron en frascos de 75 cm^2 . En primer lugar, se extraen las células del nitrógeno líquido y se llevan inmediatamente al baño a 37°C . Con el objetivo de descongelar el vial de células en el baño, se realizan movimientos en zigzag. Una vez descongelado, se traspasan las células a un tubo Falcon de 15 mL en el que se ha añadido previamente 9 mL del medio de cultivo correspondiente para cada línea celular. Este paso debe ser rápido para que las células estén el menor tiempo posible en contacto con el medio de congelación, ya que este contiene un alto porcentaje de DMSO que resulta tóxico. A continuación, con el objetivo de eliminar el medio de congelación se centrifuga 5 minutos a 1300 rpm y a 4°C , se aspira el sobrenadante y se añaden 10 mL de medio de cultivo. Por último, se resuspende y se siembra en frascos de Roux de cultivo de 75 cm^2 .

4.2.4. Mantenimiento de los cultivos celulares

La manipulación de las líneas celulares se realizó siempre en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar vertical. El material utilizado fue esterilizado previamente en autoclave para evitar toda posible contaminación. Además, ambos tipos de células superaron el test de control de contaminación por micoplasmas antes de comenzar con los experimentos.

El cultivo de ambas líneas se realizó en frascos de Roux de 75 cm^2 que se mantenían en un incubador a 37°C y bajo una atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO_2 . El medio de cultivo se reemplazó cada 2 o 3 días asépticamente.

Para el seguimiento del crecimiento de las células se utilizó un microscopio invertido, de manera que, en el momento en el que alcanzaban el 70-80% de confluencia, las células se propagaban a un nuevo frasco de 75 cm^2 . Para desprender las células de los frascos de cultivo, se utilizó tripsina 0,25% que se almacenó congelada en el caso de las células HeLa y tripsina 0,05% que se guardó en nevera en el caso de las células Caco-2/TC7.

Para la propagación del cultivo celular, en primer lugar, se atemperaba el medio de cultivo y la tripsina en el baño a 37°C . Se aspiraba el medio de cultivo del frasco, se lavaba con 9-10 mL de tampón

fosfato salino (PBS) sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , se añadían 5-6 mL de tripsina 0,05% en el caso de las Caco-2/TC7 o 3 mL de tripsina 0,25% en el caso de las HeLa y se incubaba en la estufa a 37°C 5 min o 2 min, respectivamente. Se comprobaba en el microscopio invertido que las células se habían despegado e inmediatamente se inactivaba la tripsina añadiendo el medio de cultivo correspondiente para cada línea hasta completar los 10 mL y mezclando con la pipeta serológica. Se traspasaba a un tubo Falcon de 50 mL y se volvía a resuspender aproximadamente 10 veces. Posteriormente se procedía a eliminar la tripsina de la siguiente manera: se centrifugaba 5 min a 1200 rpm y 4°C, se aspiraba el sobrenadante y se resuspendía el pellet en 10 mL del medio de cultivo correspondiente para cada línea celular. Por último, se realizaba el conteo de las células, se tomaba el volumen necesario de la suspensión y se sembraba (para extender las células por todo el frasco se realizaban movimientos en zigzag).

4.2.5. Conteo y determinación de la densidad celular

Para la realización del conteo se utilizó una cámara de Neubauer. En ella se depositaban aproximadamente 10 μL de la suspensión celular previamente homogeneizada y se realizaba el conteo de las células vivas directamente visualizando bajo el microscopio invertido. El cálculo de la densidad celular se llevó a cabo con la siguiente fórmula:

Ecuación 1: Cálculo de la densidad celular.

$$\frac{n^{\circ} \text{ células}}{\text{mL}} = \frac{n^{\circ} \text{ células} \times 10^4}{n^{\circ} \text{ cuadrantes}}$$

Además, a la hora de programar los experimentos, se tuvo en cuenta los ritmos de crecimiento de ambas líneas celulares como orientación para saber cuántas células sembrar. En la Tabla 1 se recoge el número de células que es necesario sembrar para que lleguen al 70-80% de confluencia, en los frascos de 75 cm^2 , tras el paso del tiempo (días) indicado.

Tabla 1: Ritmos de crecimiento de las líneas celulares HeLa y Caco-2/TC7. Número de células a sembrar para que alcancen el 70-80% de confluencia en un frasco T75 en el tiempo (días) indicado.

Tiempo (días)	3	4
Nº células HeLa	$1,5 \times 10^6$	7×10^5
Nº células Caco-2/TC7	$1,0 \times 10^6$	$6,5 \times 10^5$

4.3. Ensayos de toxicidad *in vitro*

4.3.1. Ensayo de reducción de la resazurina: puesta a punto

Con el objetivo de determinar la viabilidad celular después del tratamiento con los compuestos cuya toxicidad quiere ser probada (apartados 4.3.2 y 4.3.3), se utilizó un ensayo de reducción de resazurina, en concreto se utilizó el reactivo PrestoBlue de la casa comercial Thermo Fisher. El reactivo es almacenado a una temperatura de 2-8°C y protegido de la luz.

Este reactivo comercial contiene como principio activo la resazurina dentro de un sistema buffer apropiado y compatible con las condiciones fisiológicas de las células de mamíferos. El método se basa en las diferencias metabólicas entre células vivas y muertas. La resazurina es de color azul, no emite fluorescencia y no presenta toxicidad. Además, es permeable, por lo que, cuando atraviesa la membrana de las células vivas, que presentan un metabolismo activo con un ambiente reductor dentro de estas, la resazurina será reducida a resorufina que es un compuesto de color rojo y con capacidad de emitir fluorescencia. La cantidad de resorufina producida es proporcional al número de células

viables por lo que pueden cuantificarse mediante un lector de absorbancia (longitud de onda de absorción: 570 nm) o fluorescencia (se excita a 530 nm y emite a 590 nm). En los estudios de toxicidad realizados se utilizó un lector de placas que medía fluorescencia (Synergy HT, Biotek). (30,31)

Por otro lado, el tiempo de incubación para generar una señal estable depende del tipo celular por su actividad metabólica, la densidad de células, el medio de cultivo y otra serie de factores implícitos al ensayo. Por este motivo, fue esencial, antes de empezar los experimentos, realizar una cinética de medición donde se determinó la fluorescencia cada 15 minutos para comprobar el periodo de tiempo necesario que debían incubarse las células con el reactivo hasta que la señal fuera estable. Todo ello se explica con más detalle en el apartado 4.3.2.

Una de las ventajas que ofrece el reactivo PrestoBlue es que no presenta toxicidad para las células ni provoca su lisis, por lo que después de la determinación de la viabilidad, puede ser retirado y las células continúan proliferando de manera normal. De esta manera, una vez realizada la medición, el reactivo se reemplazó por medio de cultivo con los tratamientos de nuevo, lo que permitió realizar 2 lecturas de fluorescencia sucesivas (a las 24h y a las 48h).

En primer lugar, fue necesario determinar las condiciones de los ensayos de toxicidad que se iban a realizar, por ello se hicieron dos pruebas para ambas líneas celulares de manera independiente y se evaluaron los siguientes objetivos:

- Tiempo de incubación del reactivo PrestoBlue hasta que la señal se estabiliza.
- Evaluar la posible interferencia del rojo fenol (componente del medio de cultivo): la longitud de onda del espectro de excitación/emisión de la resorufina se sitúa en el rango del rojo, por lo que fue necesario determinar si el rojo fenol afectaba a su lectura.
- Evaluar la posible interferencia del DMSO en la medida de la fluorescencia de la resorufina.
- Evaluar el número de células por pocillo que se iban a sembrar para realizar los ensayos, partiendo como referencia de las utilizadas en por otros autores en sus publicaciones.

Se cultivaron las células en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer 24 horas en el caso de las HeLa y 2 semanas en el caso de las Caco-2/TC7, tiempo necesario para que se diferencien. En cuanto al número de células HeLa sembradas, en el primer experimento fue de 30000 sin embargo, tras 24 horas las células habían alcanzado la confluencia por lo que en el segundo experimento se decidió reducir el número de células sembradas a 10000 por pocillo. Esta modificación se hizo para evitar el efecto que presenta la confluencia, ya que la alta densidad celular puede provocar por un lado la reducción de la proliferación, y por otro lado que algunas células se despeguen de la superficie de cultivo. Ambos fenómenos podrían enmascarar el posible efecto citotóxico de los compuestos a evaluar. Por otro lado, en el caso de la línea celular CaCo-2/TC7 se sembraron 4000 células/pocillo siguiendo las recomendaciones del profesor Mesonero que nos había cedido las células.

Una vez pasado el tiempo de crecimiento indicado, se añaden los tratamientos (su concentración y distribución se encuentran recogidas en la Tabla 2) y se dejan incubando las células en la estufa durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se añade el reactivo PrestoBlue (10%) y se mide la fluorescencia. Con el fin de determinar el tiempo de incubación, en el que la intensidad de la señal es máxima y estable, en la primera prueba se realizó la medida cada 15 minutos durante 2 horas y 15 minutos. A continuación, se aspira el medio, se lava con PBS y se vuelven a añadir los tratamientos para repetir la lectura a las 48 horas. En base a los resultados, se decidió que el tiempo de incubación

del reactivo PrestoBlue para ambas líneas celulares fuera de 2 horas, por tanto, en la segunda prueba se midió directamente a las 2 horas.

A partir de las conclusiones deducidas de los resultados, se terminaron de elaborar los protocolos a seguir para la realización de los experimentos de toxicidad y la lectura de los mismos. Estos resultados se encuentran recogidos en el apartado 5.1.

Tabla 2: Representación esquemática de los tratamientos en una placa de 96 pocillos. Los cuadrados con borde grueso (filas C, D y E) representan pocillos con células, mientras que los cuadrados con borde fino (filas G y H) son pocillos sin células. El medio de cultivo contiene rojo fenol, por el contrario, el PBS no lo presenta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C			0,1%DMSO y medio	4%DMSO y medio	Control (sin DMSO) y medio		0,1%DMSO y PBS	4%DMSO y PBS	Control (sin DMSO) y PBS			
D			0,1%DMSO y medio	4%DMSO y medio	Control (sin DMSO) y medio		0,1%DMSO y PBS	4%DMSO y PBS	Control (sin DMSO) y PBS			
E			0,1%DMSO y medio	4%DMSO y medio	Control (sin DMSO) y medio		0,1%DMSO y PBS	4%DMSO y PBS	Control (sin DMSO) y PBS			
F												
G			0,1%DMSO y medio	4%DMSO y medio	Control (sin DMSO) y medio		0,1%DMSO y PBS	4%DMSO y PBS	Control (sin DMSO) y PBS			
H			0,1%DMSO y medio	4%DMSO y medio	Control (sin DMSO) y medio		0,1%DMSO y PBS	4%DMSO y PBS	Control (sin DMSO) y PBS			

4.3.2. Evaluación de la toxicidad intrínseca del DMSO

El DMSO es el vehículo en el que están disueltos los inhibidores de HsrA a evaluar. Por este motivo, se decidió realizar una curva de citotoxicidad con el DMSO para las dos líneas celulares con el objetivo de encontrar una concentración de DMSO que no fuera tóxica para las células y a la vez capaz de disolver los compuestos sin que estos precipiten.

En el caso de las células HeLa se realizaron 4 experimentos con 3 réplicas por concentración de DMSO en cada uno, mientras que con las Caco-2/TC7 se llevaron a cabo 3 experimentos, también con 3 réplicas por cada concentración de DMSO en cada experimento realizado.

Las concentraciones de DMSO que se evaluaron fueron de: 0,1%, 0,4%, 0,8%, 1%, 1,2%, 1,5%, 1,8% y 2% (v/v). Además de dos controles, un control negativo sin DMSO y un control positivo con 1% (v/v) de tritón X-100, detergente no iónico capaz de desnaturalizar las membranas celulares, por lo que es letal para las células.

El protocolo seguido fue el siguiente. En primer lugar, se sembraron las células en placas de 96 pocillos, 10000 células HeLa/pocillo y 4000 células Caco-2/TC7/pocillo, y se dejaron crecer 24 horas y 2 semanas, respectivamente. Las células Caco-2/TC7 requieren de este periodo de 14 días para su diferenciación. Al cabo de ese tiempo, se añadieron los tratamientos con DMSO y se determinó la fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 530 nm y de emisión de 590 nm, a las 24 y a las 48 horas. Para determinar la fluorescencia, se añadió el reactivo PrestoBlue con una concentración del 10% (v/v) y se dejaron las células incubando en la estufa durante 2 horas. Una vez hecha la medida, se realizaron lavados con PBS y se volvieron a añadir los tratamientos para medir pasadas otras 24 horas.

Finalmente, con los resultados obtenidos, se calcularon las curvas de citotoxicidad del DMSO en ambas líneas celulares y se decidió disolver los compuestos para los posteriores experimentos de toxicidad en un 1,2% de DMSO, concentración para la cual el DMSO no muestra toxicidad en ninguno de los dos tipos de células y para la que no se esperaba la aparición de precipitado.

4.3.3. Ensayos de toxicidad de los compuestos de interés

Los ensayos de toxicidad de los compuestos I, V, VIII y XII se llevaron a cabo solo en células HeLa. No fue posible realizar el ensayo en células CaCo2/TC7 debido a la falta de tiempo por el estado de alarma ante el Covid-19. El protocolo seguido fue el mismo al explicado en el apartado anterior. Todos los compuestos a evaluar presentan una baja solubilidad en agua por lo que se decidió utilizar la concentración más alta de DMSO a la cual no existía efecto citotóxico sobre las líneas celulares, lo que se corresponde con un 1,2% de DMSO, para disolver todos los compuestos. Los experimentos para evaluar la toxicidad en cada caso se realizaron por triplicado.

Las concentraciones de compuesto que se probaron en todos los casos fueron de 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL y 0,125 µg/mL, a excepción de la primera prueba del compuesto V para el cual no se probaron las concentraciones de 128 µg/mL, 64 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL y 0,125 µg/mL) pero permitió caracterizar su baja solubilidad en agua. Además, se añadió en cada caso un control en ausencia de compuesto y con 1,2% DMSO.

4.3.4. Concentración citotóxica media (CC50) e índice terapéutico (IT)

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos, se estimó la concentración citotóxica media (CC50) para cada uno de los compuestos, es decir, la concentración del compuesto que produce la lisis del 50% de las células del cultivo.

Teniendo en cuenta la CC50 calculada y la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida a partir de estudios previos para cada compuesto, se puede calcular el índice terapéutico (IT) como un valor numérico adimensional resultado del cociente CC50/CMI. Este valor proporciona una idea acerca de la seguridad de un fármaco comparando la concentración a la que causa un efecto terapéutico frente a la que causa toxicidad provocando efectos adversos en el paciente (32).

4.3.5. Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el software estadístico Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, EEUU). Las diferencias entre grupos se analizaron mediante el test de T de student. Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

Este análisis estadístico únicamente se efectuó de los resultados obtenidos de la evaluación de la toxicidad intrínseca del DMSO, ya que en el caso de los ensayos de toxicidad de los inhibidores de HsrA no se realizaron un número de replicas suficientes.

5. RESULTADOS

5.1. Puesta a punto del ensayo de reducción de la resazurina

De los resultados obtenidos de este primer experimento, se pudieron determinar los protocolos a seguir en los análisis de citotoxicidad del DMSO y de los compuestos efectivos frente a *H. pylori* mediante el ensayo de reducción de la resazurina. La puesta a punto de la técnica conllevó a los siguientes resultados experimentales:

- La señal de fluorescencia medida se estabilizó a las 2 horas en ambas líneas celulares, por tanto, se estableció un tiempo de incubación del reactivo PrestoBlue de 2 horas tras su adición a los cultivos.
- El rojo fenol no interfirió en la medida: al comparar los resultados de los controles sin células ni DMSO de los pocillos con medio de cultivo (con rojo fenol) con los pocillos con PBS (sin rojo fenol) no se observaron diferencias relevantes. Por lo tanto, no fue necesario lavar para eliminar el rojo fenol antes de medir.
- El DMSO no interfirió en la medición: al comparar los pocillos sin células con concentraciones bajas (0,1% v/v) y altas (4% v/v) de DMSO no se observaron grandes diferencias en la señal, por tanto, el DMSO no absorbe a la longitud de onda a la que se realizó la medición.
- Se decidió que el número de células a sembrar para realizar los experimentos fuera de 10000 células/pocillo en el caso de las HeLa, puesto que una densidad celular superior podría enmascarar los efectos tóxicos del DMSO lo que podría interferir también con los compuestos efectivos frente a *H. pylori* que se quieren probar. Para las células CaCo2/TC7 se estipuló una cantidad de 4000 células/pocillo.

5.2. Evaluación de la de toxicidad intrínseca del DMSO (vehículo)

Para estudiar la toxicidad del DMSO se añadieron las concentraciones de 0,1%, 0,4%, 0,8%, 1%, 1,2%, 1,5%, 1,8% y 2% (v/v) a las líneas celulares, y con ello se estimó la concentración óptima capaz de disolver los fármacos sin que precipiten, pero además, sin que se viera afectada la viabilidad celular.

Los resultados de la toxicidad en las células HeLa se encuentran reflejados en la Figura 1. Se observó que a las 24 horas no hay un efecto importante del DMSO sobre la viabilidad celular hasta la concentración de 1,8% donde se observó una ligera pero significativa disminución de la viabilidad, efecto que también se pudo ver a la concentración de 2%. Mediante regresión lineal a partir de los gráficos, se determinó que la viabilidad celular se hace inferior al 90% a partir de una concentración de 2,07% de DMSO.

A las 48 horas, los resultados fueron similares a los observados a las 24 horas, excepto que también se percibió una disminución significativa de la viabilidad celular a la concentración de 1,5% de DMSO. De la misma manera, mediante regresión lineal se calculó que a partir del 1,88% de DMSO la viabilidad celular desciende por debajo del 90%.

En base a estas observaciones, se decidió utilizar una concentración de 1,2% de DMSO para disolver los compuestos, ya que es la concentración más alta que no afecta de forma significativa a la viabilidad celular en ninguno de los periodos de tiempo evaluados.

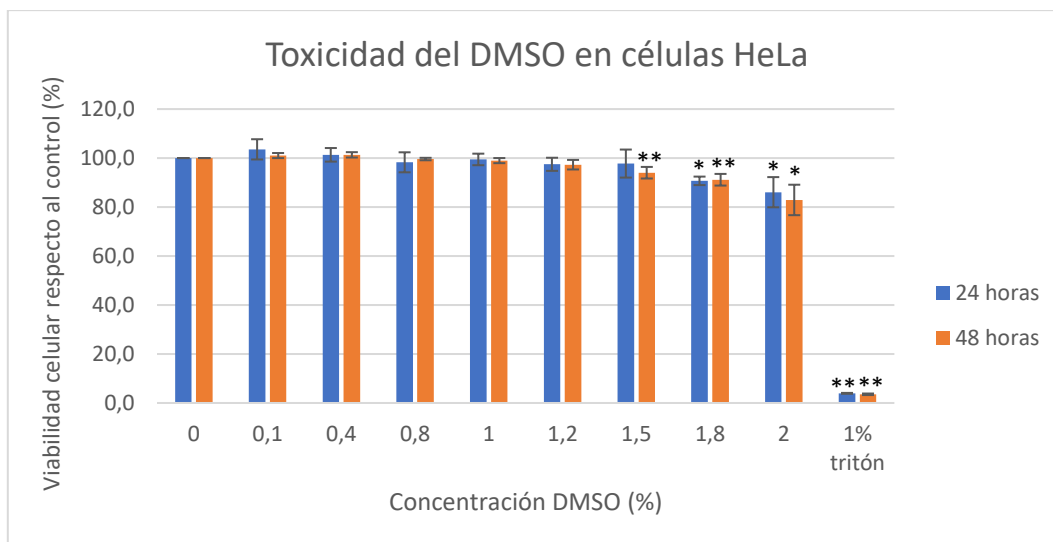


Figura 1: Variación de la viabilidad celular de las células HeLa en presencia de diferentes concentraciones de DMSO a las 24 horas (barras azules) y a las 48 horas (barras naranjas). Se incluye un control positivo de citotoxicidad con 1% de tritón. Los resultados están representados en porcentaje respecto al control y se muestra la media y la desviación estándar a cada concentración. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. control. ($n=4$)

Por otro lado, en las células Caco-2/TC7 (Figura 2), aunque se observó un descenso de la viabilidad celular con las concentraciones de DMSO más elevadas y de manera más pronunciada tras 48 horas de incubación, llegando a ser de un 74,3% del control a la concentración de 2% de DMSO. Este efecto no fue estadísticamente significativo a ninguna de las concentraciones, probablemente debido a la desviación estándar que se observa a las concentraciones más altas. En las células Caco2/TC7 el descenso de viabilidad al 90% se produjo con una concentración de 2,58% a las 24 horas y de 1,12% de DMSO a las 48 horas, según los valores obtenidos de la regresión lineal.

En el caso de esta línea celular sólo dio tiempo a realizar 3 réplicas del experimento, por lo que sería conveniente realizar un cuarto experimento para comprobar si se mantienen estos resultados. Si se confirman, se utilizará la misma concentración de DMSO que para las células HeLa para disolver los compuestos.

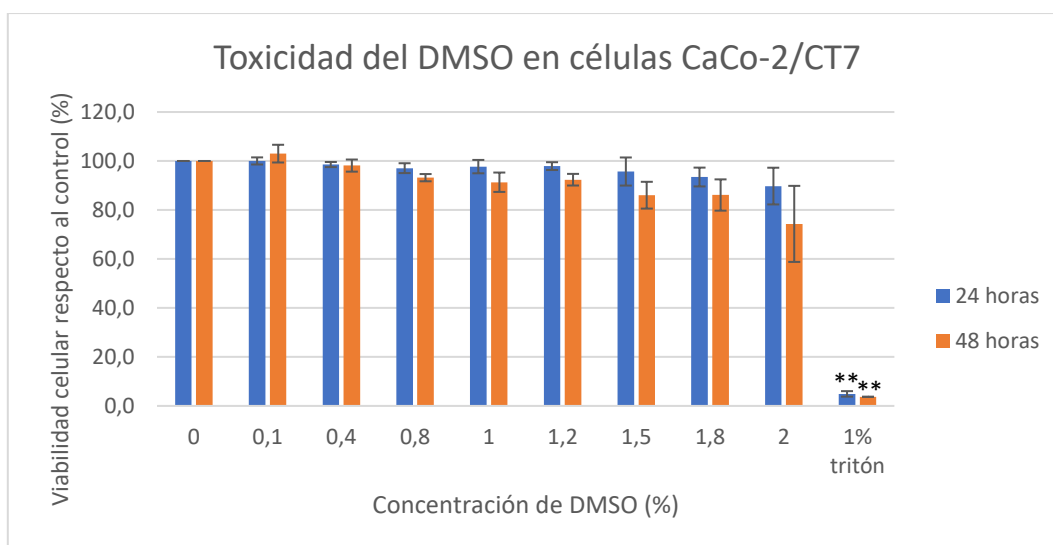


Figura 2: Variación de la viabilidad celular de las células CaCo2/TC7 en presencia de diferentes concentraciones de DMSO a las 24 horas (barras azules) y a las 48 horas (barras naranjas). Se incluye un control positivo de citotoxicidad con 1% de tritón. Los resultados están representados en porcentaje respecto al control y se muestra la media y la desviación estándar a cada concentración. ** $p < 0,01$ vs. control. ($n=3$)

5.3. Citotoxicidad de los inhibidores I, V, VIII y XII de HsrA en células HeLa

Como se ha indicado anteriormente, a pesar de que el objetivo inicial fue realizar los ensayos de citotoxicidad en ambas líneas celulares humanas, debido a la falta de tiempo por la crisis sanitaria del SARS CoV-2, estos ensayos se realizaron únicamente en células HeLa.

5.3.1. Compuesto I

En cuanto al compuesto I (Figura 3), no se observaron grandes diferencias en el efecto tóxico a las 24 y 48 horas, hasta las concentraciones más altas de compuesto donde el efecto fue más marcado tras 48 horas de tratamiento. A las 24 horas la viabilidad celular no se vio prácticamente afectada en el rango de concentraciones de 0,125-16 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, el efecto se empezó a hacer notable a la concentración de 64 $\mu\text{g/mL}$, a partir de la cual la tasa de supervivencia celular cayó llegando a 53,3% de viabilidad a la concentración de 128 $\mu\text{g/mL}$.

Por otro lado, a las 48 horas, el descenso de la viabilidad estuvo más marcado a las concentraciones más altas. A lo largo de las diferentes concentraciones la viabilidad celular presentó pequeñas fluctuaciones, pero sin diferencias importantes con respecto a los resultados que se obtuvieron a las 24 horas a concentraciones inferiores o iguales a 32 $\mu\text{g/mL}$. A partir de esta concentración la viabilidad celular cayó de forma pronunciada llegando a 17,5% con un tratamiento de 128 $\mu\text{g/mL}$. El valor de la CC50 se encuentra próximo a la concentración de 64 $\mu\text{g/mL}$, donde la viabilidad cayó hasta 42,85%.

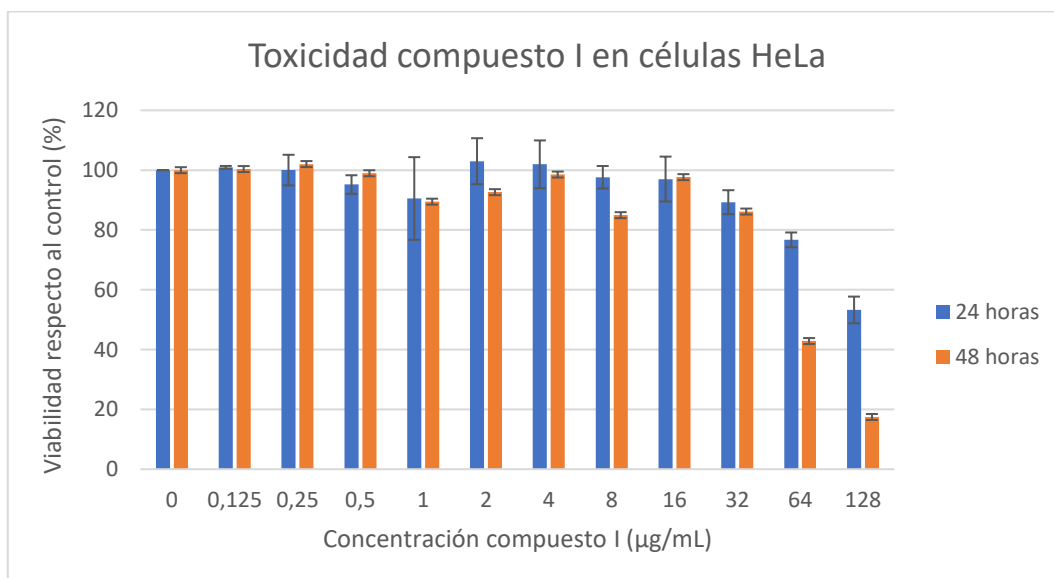


Figura 3: Variación de la viabilidad celular de las células HeLa en presencia de diferentes concentraciones de compuesto I a las 24 horas (barras azules) y a las 48 horas (barras naranjas). Los resultados están representados en porcentaje respecto al control y se muestra la media y la desviación estándar a cada concentración.

5.3.2. Compuesto V

La toxicidad del compuesto V (Figura 4) fue muy parecida a las 24 y a las 48 horas. La viabilidad celular disminuyó ligeramente desde las concentraciones más bajas. Sin embargo, a la concentración más alta ensayada (128 $\mu\text{g/mL}$) la viabilidad celular se mantuvo en 67,6% a las 24 horas y en 58,5% a las 48 horas. Por lo tanto, con ninguna de las concentraciones ensayadas se alcanzó el valor de CC50 a ninguno de los tiempos de incubación.

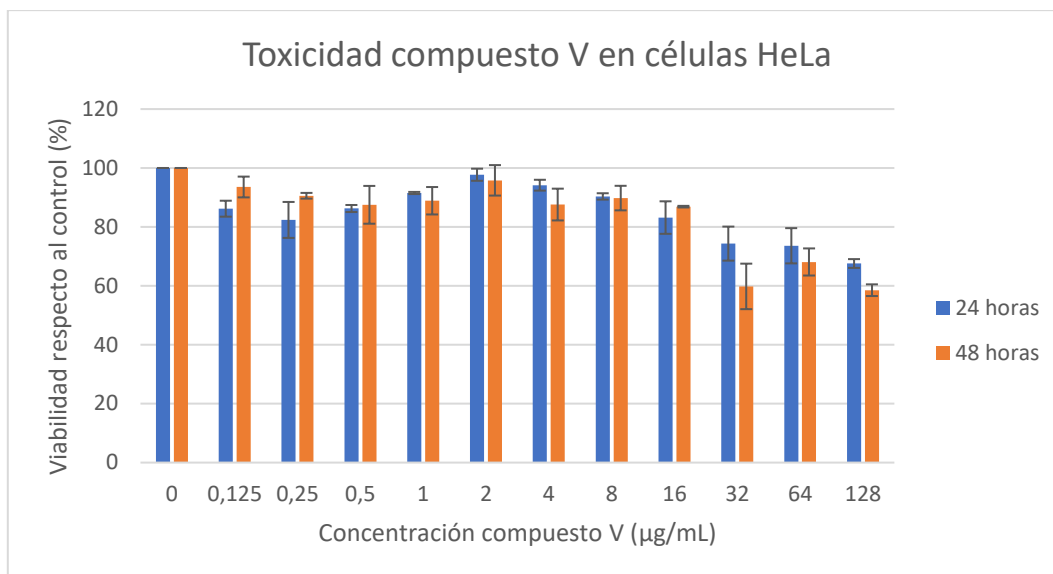


Figura 4: Variación de la viabilidad celular de las células HeLa en presencia de diferentes concentraciones de compuesto V a las 24 horas (barras azules) y a las 48 horas (barras naranjas). Los resultados están representados en porcentaje respecto al control y se muestra la media y la desviación estándar a cada concentración.

5.3.3. Compuesto VIII

A primera vista, se apreció que la toxicidad del compuesto VIII (Figura 5) era elevada. A las 24 horas hubo una caída progresiva de la viabilidad desde 1 µg/mL, que se hizo más pronunciada a partir de 4 µg/mL y que llegó a porcentajes de viabilidad inferiores al 40% a partir de los 32 µg/mL.

A las 48 horas se observó un efecto citotóxico mayor, especialmente a partir de 8 µg/mL donde la viabilidad disminuyó hasta un 20,3%. A partir de aquí la tasa de supervivencia celular fue muy baja, con porcentajes de viabilidad por debajo del 10%.

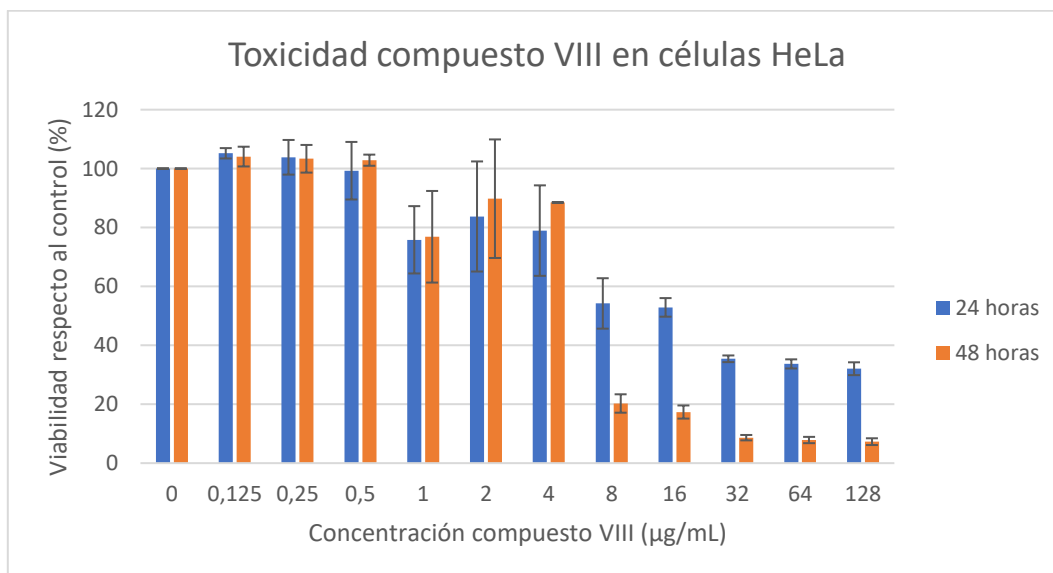


Figura 5: Variación de la viabilidad celular de las células HeLa en presencia de diferentes concentraciones de compuesto VIII a las 24 horas (barras azules) y a las 48 horas (barras naranjas). Los resultados están representados en porcentaje respecto al control y se muestra la media y la desviación estándar a cada concentración.

5.3.4. Compuesto XII

El compuesto XII (Figura 6) también presentó una toxicidad elevada en células HeLa que se hizo muy notable incluso a las 24 horas tras su adición. En los dos periodos de tiempo testados se produjo un descenso marcado de la viabilidad a partir de la concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$, siendo este más drástico a las 48 horas.

La caída de la viabilidad más pronunciada se dio a las 48 horas entre las concentraciones de 2 y 4 $\mu\text{g/mL}$, donde descendió de 83,7% de viabilidad a 30,1%, llegando a valores de viabilidad inferiores al 10% a partir de los 8 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, a las concentraciones más altas de compuesto no existieron diferencias relevantes en el efecto citotóxico entre las 24 y las 48 horas de tratamiento.

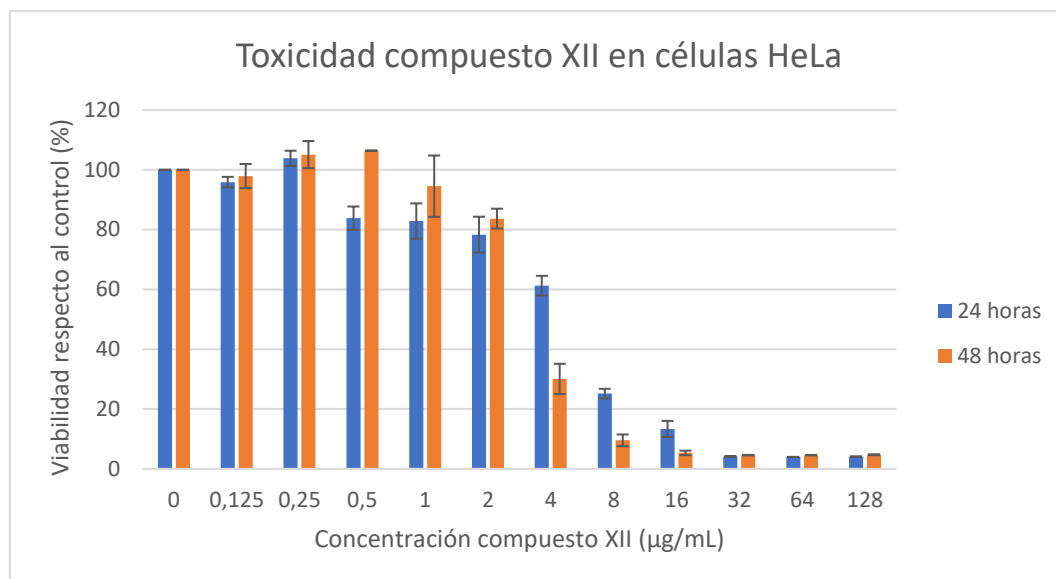


Figura 6: Variación de la viabilidad celular de las células HeLa en presencia de diferentes concentraciones de compuesto XII a las 24 horas (barras azules) y a las 48 horas (barras naranjas). Los resultados están representados en porcentaje respecto al control y se muestra la media y la desviación estándar a cada concentración.

5.3.5. Concentración citotóxica media (CC50) de los compuestos de interés

En la Tabla 3 se indican los valores de CC50 calculados a partir de los respectivos gráficos por regresión lineal. Los resultados de CC50 para cada compuesto en células HeLa reflejan una alta citotoxicidad de los compuestos VIII y XII, una baja toxicidad del compuesto I y una muy baja toxicidad del compuesto V.

Tabla 3: Valores de CC50 de los compuestos I, V, VIII y XII a las 24 y 48 horas tras su adición.

Compuesto	CC50 24 horas ($\mu\text{g/mL}$)	CC50 48 horas ($\mu\text{g/mL}$)
I	139,02	73,19
V	181,11	135,31
VIII	19,89	7,35
XII	4,52	4,51

5.4. Cálculo del índice terapéutico (IT)

Como se ha comentado anteriormente, el cálculo del índice terapéutico (IT) viene dado por el cociente entre la concentración citotóxica media (CC50) obtenida en el presente trabajo y la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a las cepas *H. pylori* 26695 (ATCC 700392) y *H. pylori* UA1182 (ATCC 700684), procedente de estudios previos. En la Tabla 4 se aprecian los valores de IT de cada compuesto, para cada cepa y tiempos de exposición analizados.

Tabla 4: Valores de CC50, CMI e IT de los compuestos I, V, VIII y XII a las 24 y 48 horas tras su adición.

Compuesto	CC50 (µg/mL)		CMI (µg/mL)		IT (CC50/CMI)			
	24 h	48 h	<i>H. pylori</i> 26695	<i>H. pylori</i> UA1182	<i>H. pylori</i> 26695		<i>H. pylori</i> UA1182	
					24 h	48 h	24 h	48 h
I	139,02	73,19	2	1	69,51	36,60	139,02	73,19
V	181,11	135,31	0,063	0,031	2874,76	2147,78	5842,26	4364,84
VIII	19,89	7,35	2	1	9,95	3,68	19,89	7,35
XII	4,52	4,51	2	0,5	2,26	2,26	9,04	9,02

Los resultados indican un bajo índice terapéutico para aquellos compuestos que se mostraron muy tóxicos (VIII y XII) y un muy elevado índice terapéutico (> 2000) para el compuesto V en todas las condiciones ensayadas.

6. DISCUSIÓN

El desarrollo y aprobación de nuevos medicamentos de uso humano es un proceso largo y requiere de una serie de etapas esenciales desde el descubrimiento de posibles candidatos hasta su autorización y comercialización. Dos partes imprescindibles del proceso son los ensayos preclínicos y los posteriores ensayos clínicos en humanos. Dentro de los ensayos preclínicos son esenciales los estudios de toxicidad, se debe demostrar que los nuevos fármacos presentan toxicidad específica contra el microorganismo diana a bajas concentraciones, pero no son tóxicos para el ser humano. Para ello, se realizan análisis preclínicos tanto *in vitro* en líneas celulares como *in vivo* en diferentes modelos animales. Posteriormente, con los datos obtenidos, para evaluar la toxicidad se pueden calcular la CC50 *in vitro* (concentración del compuesto que produce la muerte celular del 50% de las células del cultivo) o la LD50 *in vivo* (concentración de compuesto que provoca la muerte del 50% de los animales de experimentación) (33).

En el momento de la práctica clínica, la dosis de administración del antimicrobiano debe encontrarse en el rango de concentraciones para las cuales existe efecto terapéutico sin presentar toxicidad. En este sentido es importante el concepto de índice terapéutico (IT) que referido a estudios preclínicos *in vitro* viene dado por la relación entre la concentración citotóxica media (CC50) y la concentración mínima inhibitoria (CMI), de tal forma la dosis de administración del antimicrobiano debe ser superior a la CMI e inferior a la CC50. Lo ideal es que este rango sea lo más amplio posible con el fin de conseguir un margen de seguridad adecuado. A menor IT mayor es el riesgo de la administración, mientras que cuanto mayor sea este cociente mejor es el fármaco puesto que es más seguro. Los compuestos con mayor IT serán los mejores candidatos para el tratamiento de las infecciones por *H. pylori*. No obstante, existen compuestos con un índice terapéutico estrecho o

reducido, es decir son aquellos que presentan una ventana muy pequeña de dosis en la que el efecto terapéutico es beneficioso y no existen efectos adversos graves. De esta manera, la *Food and Drug Administration* (FDA) considera que un medicamento presenta un índice terapéutico estrecho cuando existe menos del doble de diferencia entre ambas dosis y, por tanto, el uso del medicamento requerirá de un estricto seguimiento y monitorización del paciente. En estos pacientes, pequeñas variaciones de la concentración del fármaco dentro del organismo podrían llevar a un fallo terapéutico o a la aparición de toxicidad severa y, por tanto, es necesario considerar la relación riesgo/beneficio. (32)

La elección de las líneas celulares humanas HeLa y CaCo-2/TC7 resulta interesante a la hora de contrastar los resultados de citotoxicidad obtenidos en ambas. Ambas son líneas celulares tumorales y como tales presentan un crecimiento indefinido, si bien presentan una serie de diferencias que hacen que puedan utilizarse como modelos celulares complementarios para testar la toxicidad *in vitro* de nuestros compuestos. Las células HeLa son ampliamente utilizadas en los estudios de toxicidad en cultivos celulares, se mantienen indiferenciadas a lo largo de los sucesivos pases de cultivo y además presentan un crecimiento rápido, de esta manera permiten realizar el estudio de citotoxicidad en un plazo de 24 horas. Por el contrario, el clon TC7 de la línea Caco-2 únicamente se mantiene indiferenciado durante la fase de crecimiento exponencial, de forma que a medida que alcanza un mayor grado de confluencia va adquiriendo un alto grado de diferenciación exhibiendo características morfológicas y bioquímicas muy semejantes a las de los enterocitos que forman el borde en cepillo en el intestino, por lo que se utiliza ampliamente como modelo de epitelio intestinal “normal” tanto para el estudio de procesos fisiológicos intestinales como para realizar pruebas de toxicidad *in vitro*. El inconveniente de utilizar estas células es el tiempo requerido para que alcancen la diferenciación que suele ser de 15 a 21 días, lo que en nuestro caso motivó que no se pudieran realizar los experimentos con los diferentes inhibidores de HsrA en esta línea. No obstante, consideramos importante confirmar en el futuro los resultados de toxicidad obtenidos con las células HeLa en células Caco-2/TC7 diferenciadas, ya que podría ocurrir que nuestros compuestos no fueran tóxicos en la línea celular HeLa (tumoral), pero sí en células normales. (27,28)

Otro de los aspectos a destacar es la utilización de un ensayo de reducción de resazurina con el reactivo PrestoBlue como técnica para evaluar la viabilidad de los cultivos, pues ha permitido realizar el análisis en dos tiempos sucesivos, a las 24 y a las 48 horas sobre el mismo cultivo celular, ya que no produce la lisis de las células, y además de forma relativamente rápida. Por un lado, este reactivo permite ahorrar tiempo, puesto que no requiere de pasos previos de solubilización, se añade directamente a las células en cultivo al terminar el período de tratamiento con los compuestos a evaluar y tras el tiempo adecuado de incubación se realiza la medida. Esto es una ventaja frente a otros métodos utilizados para medir la viabilidad como los ensayos de reducción de sales de tetrazolio (MTT) que requieren de la previa solubilización del precipitado de formazán antes del análisis de la absorbancia, y además son por lo general menos sensibles. Por otro lado, existen los ensayos de ATP, estos van a requerir de la acción de un detergente para lisar las células y liberar el ATP presente en aquellas vivas, lo que permitirá su detección mediante la enzima luciferasa tras añadir el sustrato luciferina. El reactivo PrestoBlue en comparación con estos, no provoca la lisis celular y por tanto permite realizar varias medidas a distintos tiempos o utilizar el cultivo para estudios funcionales posteriores. Otra ventaja es la posibilidad de utilizar la resazurina como método fluorométrico y colorimétrico. Sin embargo, entre las desventajas de la técnica se encuentra la posible interferencia con algunos componentes del medio o el efecto tóxico directo sobre las células, por ello es muy importante la puesta a punto de la técnica como paso previo a la realización de los estudios. (31)

En cuanto a los resultados de toxicidad de los compuestos testados, aquellos que presentan un mayor efecto tóxico en células HeLa son los compuestos VIII y XII. El compuesto VIII es capaz de matar a más del 50% de las células del cultivo con 19,89 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 horas, consiguiéndolo a una concentración de tan solo 7,35 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 horas. En cuanto al compuesto XII, es el que presenta mayor toxicidad llegando a una CC50 de 4,52 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 horas y a una similar a las 48 horas (4,51 $\mu\text{g/mL}$), mientras que el compuesto I necesita concentraciones elevadas para conseguir la muerte celular, de 139,02 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 horas y de 73,19 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 horas. El compuesto V presenta una citotoxicidad muy baja con una CC50 superior a 128 $\mu\text{g/mL}$, tanto a las 24 como a las 48 horas tras su adición. En relación con estos datos, se debe tener en cuenta que son solamente resultados preliminares puesto que provienen únicamente de 1 experimento con 3 determinaciones. Para poder sacar conclusiones sólidas sería necesario aumentar el número de experimentos y así contar con un mínimo de 3 o 4 réplicas con 3 determinaciones cada una.

Con el objetivo de analizar los valores de IT calculados (Tabla 4), se considerará que el antimicrobiano presenta un buen perfil de seguridad cuando su IT sea superior a 10 (32). Considerando este criterio y teniendo presente que se trata de resultados preliminares, se distinguen compuestos que presentan un menor IT, tanto en la cepa *H. pylori* 26695 como en la *H. pylori* UA1182, son los compuestos VIII y XII los cuales coinciden con los más tóxicos y por tanto no presentan un perfil de seguridad adecuado para su uso en la clínica. Esto se debe a que su IT es inferior a 10 en la mayoría de condiciones ensayadas. Por el contrario, los compuestos I y V tienen un IT elevado, muy superior a 10, en las dos cepas testadas y en los distintos tiempos (24 y 48 horas), lo que se considera un criterio de seguridad. Además, cabe destacar que el margen terapéutico del compuesto V es muy alto, con un IT superior a 2000, lo que resulta ventajoso pues existe un amplio abanico de dosis en las que el compuesto presenta efectividad sin causar efectos adversos graves. Por otro lado, de manera general para todos los compuestos testados, los valores reflejados para *H. pylori* UA1182 son más altos, siendo por tanto más efectivos para el tratamiento de esta cepa.

Resulta de interés, además, comparar estos índices terapéuticos con los de algunos antibióticos de primera línea utilizados en el tratamiento de la infección por *H. pylori*. En el caso concreto del metronidazol, este presenta un IT por debajo de 350 en distintas cepas de *H. pylori* de referencia (SS1, NCTC y 26695) testadas (34), valor muy inferior al obtenido para el compuesto V en las condiciones ensayadas en este trabajo (> 2000).

Por otro lado, también se pueden comparar estos valores de IT con los de otros antimicrobianos. En la actualidad existen diversos estudios que se centran en la búsqueda de nuevos antimicrobianos mediante estrategias basadas en la diana. De esta manera, se testan colecciones de compuestos capaces de inhibir una diana esencial del microorganismo y evitar el crecimiento bacteriano. Frente a *H. pylori* se han probado otras dianas como es la flavodoxina, que forma un bolsillo cercano al sitio de unión del cofactor y al que son capaces de unirse algunos compuestos interfiriendo en las funciones metabólicas de la bacteria. En un estudio se identificaron varios de estos compuestos y se modificaron químicamente con el objetivo de disminuir la toxicidad y aumentar el IT (34).

Por lo general, la mayoría de los derivados de compuestos basados en nitroetileno y nitrobenzoxadiazol presentan IT inferiores a 10, algunos de ellos se encuentran en el rango 10-30 y muy pocos presentan una ventana terapéutica amplia con ITs superiores a 70, siendo estos últimos comparables a los compuestos I y V testados en este trabajo y por tanto son los que presentan un mayor potencial para ser utilizados en clínica. De cualquier forma, el inhibidor de flavodoxina con

mayor IT presenta un valor de 345, lejos del valor alcanzado por el compuesto V que es superior a 2000 en la cepa 26695 y a 4000 en la cepa UA1182, lo que refleja su alto potencial clínico.

Estos valores tan bajos asociados a la mayor parte de los compuestos son un reflejo de la dificultad que presenta el hecho de encontrar o desarrollar nuevos antimicrobianos. Por ello, resulta importante el desarrollo de estrategias que consigan incrementar el IT de los antimicrobianos ya testados y otras mejoras que permitan su uso de manera individual, aunque una de las estrategias más empleadas es su uso combinado junto a otros agentes terapéuticos. En la literatura se pueden encontrar multitud de ejemplos y estrategias para la reducción de la toxicidad y mejora del IT, una de las más importantes es el diseño racional o modificación al azar de determinados residuos o radicales con el fin de obtener análogos de antimicrobianos ya caracterizados. Basándose en esta metodología, en un estudio de 2014 (35) mediante PCR mutagénica se consigue la reducción de la toxicidad y el consiguiente aumento del IT de un péptido antimicrobiano llegando a un valor 50 veces superior al original. En otro ejemplo de estudio (36) modifican específicamente residuos de aminoácidos de dos péptidos antimicrobianos consiguiendo también un aumento del IT 55 y 730 veces por encima del original.

En vista a todo esto y centrándonos en el trabajo realizado, el compuesto V es el mejor candidato a fármaco para el tratamiento de infecciones por *H. pylori* pues es el que cuenta con una menor toxicidad reflejada en un valor de CC50 superior a los 128 µg/mL, una mayor eficacia con valores de CMI inferiores a 1 y tiene el IT más alto, superior a 2000 en la cepa 26695 y superior a 4000 en la cepa UA1182, pudiendo considerarse seguro y adecuado para su uso en terapia, según los resultados obtenidos hasta ahora.

7. CONCLUSIONES

1. El tiempo de incubación óptimo del reactivo PrestoBlue para la estimación de la viabilidad de células HeLa y Caco-2/TC7 mediante el ensayo de reducción de la resazurina es de 2 h. Se descartan posibles interferencias con otros componentes del ensayo. El rojo fenol que forma parte del medio de cultivo y el DMSO, vehículo de los compuestos, no presentan emisión de fluorescencia a la longitud de onda medida en los ensayos.
2. El DMSO no afectó de forma significativa la viabilidad celular en células HeLa y Caco-2/TC7 a concentraciones iguales o inferiores a 1,2 % (v/v). En tal sentido, la evaluación de la citotoxicidad de los inhibidores de HsrA en estas líneas celulares no podrá superar el 1,2 % de DMSO como vehículo de estos compuestos.
3. El compuesto V evidenció una citotoxicidad celular muy baja en células HeLa, tanto a 24 como a 48 h de exposición. La CC50 de este compuesto fue 135 µg/mL tras 48 h de exposición, con un índice terapéutico muy elevado (> 2000) para dos cepas de *H. pylori* diferentes. Los resultados sugieren un gran potencial de este inhibidor de HsrA como candidato a nueva droga antimicrobiana para el tratamiento de la infección por *H. pylori*.
4. Los compuestos VIII y XII evidenciaron una toxicidad muy elevada en células HeLa, siendo los más tóxicos de entre los inhibidores de HsrA testados en este trabajo. Ambos compuestos exhibieron una CC50 en células HeLa inferior a 10 µg/mL tras 48 h de exposición, con un índice terapéutico inferior a 10 para ambos compuestos.

5. El compuesto I evidenció una citotoxicidad relativamente baja en células HeLa, con una CC50 de 73 µg/mL tras 48 h de exposición y un índice terapéutico superior a 35 para dos cepas de *H. pylori* diferentes.

CONCLUSIONS

1. The optimal incubation time for PrestoBlue Reagent for viability estimation of HeLa and CaCo2/TC7 cells using the Resazurin Reduction Assay is 2 h. Interference with other assay components is ruled out. Phenol red, which is part of the culture medium, and DMSO, which is a carrier for the compounds, do not present fluorescence emission at the wavelength measured in the assays.
2. DMSO does not significantly affect cell viability in HeLa and Caco-2/TC7 cells at concentrations less than or equal to 1,2 % (v/v). In this regard, the evaluation of HsrA inhibitors cytotoxicity shall not exceed 1,2 % of DMSO in these cell lines as a vehicle for these compounds.
3. Compound V showed very low cellular cytotoxicity in HeLa cells at 24 and 48 h of exposure. After 48h of exposure, the CC50 of this compound was 135 µg/mL, with a very high therapeutic index (> 2000) for two different *H. pylori* strains. The results suggest a great potential of this HsrA inhibitor like a candidate for a new antimicrobial drug for *H. pylori* infection treatment.
4. Compounds VIII and XII showed very high toxicity in HeLa cells, being the most toxic of the HsrA inhibitors tested in this work. Both compounds have a CC50 below 10 µg/mL in HeLa cells after 48 h of exhibition. They also have a therapeutic index below 10 for both cases.
5. Compound I showed relatively low cytotoxicity in HeLa cells, with a CC50 of 73 µg/mL after 48 h of exposure and a therapeutic index above 35 for two different *H. pylori* strains.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Repetir los ensayos de citotoxicidad de los inhibidores de HsrA en células HeLa hasta alcanzar un número de réplicas apropiado que garantice la reproducibilidad de los resultados y permita el análisis estadístico de los mismos.
- Evaluar la citotoxicidad de los inhibidores de HsrA de mayor interés en células CaCo2/TC7 y en cultivos celulares primarios.
- Evaluar la toxicidad de los compuestos de mayor interés en modelos *in vivo*, tales como *Caenorhabditis elegans* y ratones.
- Proponer dosis terapéuticas de cada compuesto y terapias combinadas de los mismos para su empleo en ensayos de eficacia preclínica, teniendo en cuenta los valores de índices terapéuticos obtenidos.

9. REFERENCIAS

1. Kusters JG, Van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev. 2006;19(3):449–90.
2. Hu Y, Zhu Y, Lu NH, Shi Q. Recent progress in *Helicobacter pylori* treatment. Chin Med J (Engl). 2020;133(3):335–43.
3. Mascellino MT, Oliva A, De Angelis M, Pontone S, Porowska B. *Helicobacter pylori* infection: Antibiotic resistance and eradication rate in patients with gastritis showing previous treatment failures. New Microbiol. 2018;41(4):306–9.
4. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. Gastroenterology [Internet]. 2017;153(2):420–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
5. Burucoa C, Axon A. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2017;22:1–5.
6. Crowe SE. *Helicobacter pylori* Infection. N Engl J Med. 2019;380(12):1158–65.
7. Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis. Futur Oncol. 2014;10(8):1487–500.
8. Floch P, Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* strains and gastric MALT lymphoma. Toxins (Basel). 2017;9(4).
9. Amieva MR, El-Omar EM. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. Gastroenterology. 2008;134(1):306–23.
10. Camilo V, Sugiyama T, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2017;22:1–6.
11. Blanchard T, Nedrud J. Laboratory Maintenance of *Helicobacter* Species. Maryl Law Rev [Internet]. 2006;(1). Available from: http://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=995272
12. Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T, Ohtani M, Suto H, Ito Y, et al. Distinct Diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* Genes of *Helicobacter pylori* Associated with Peptic U. Society. 2005;43(8):3906–16.
13. O’Morain NR, Dore MP, O’Connor AJP, Gisbert JP, O’Morain CA. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in 2018. Helicobacter. 2018;23:1–9.
14. Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain C, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon A, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence consensus report. Gut. 2017;66(1):6–30.
15. Sanz JB. Uso adecuado de los Inhibidores de la bomba de protones. Actual en Medicina Fam. 2012;8(4):218–20.
16. Graham DY, Shiotani A. Newer concepts regarding resistance in the treatment *Helicobacter pylori* infections. Nat Clin Pr Gastroenterol Hepatol. 2008;5(6):321–31.
17. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018;18(3):318–27.
18. Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E. Prevalence of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions. Gastroenterology [Internet]. 2018;155(5):1372–1382.e17. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.007>
19. Zhang Y, Wen Y, Xiao Q, Zheng W, Long G, Chen B, et al. Mutations in the antibiotic target genes related to clarithromycin, metronidazole and levofloxacin resistance in *Helicobacter pylori* strains from children in China. Infect Drug Resist. 2020;13:311–22.

20. Mégraud F, Hazell S, Glupczynski Y. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. 2001.
21. González A, Salillas S, Velázquez-Campoy A, Espinosa Angarica V, Fillat MF, Sancho J, et al. Identifying potential novel drugs against *Helicobacter pylori* by targeting the essential response regulator HsrA. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–13.
22. Beier D, Frank R. Molecular Characterization of Two-Component Systems of. *Society*. 2000;182(8):2068–76.
23. Hong E, Hyang ML, Ko H, Kim DU, Jeon BY, Jung J, et al. Structure of an atypical orphan response regulator protein supports a new phosphorylation-independent regulatory mechanism. *J Biol Chem*. 2007;282(28):20667–75.
24. Delany I, Spohn G, Rappuoli R, Scarlato V. Growth phase-dependent regulation of target gene promoters for binding of the essential orphan response regulator HP1043 of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 2002;184(17):4800–10.
25. De la Cruz MA, Ares MA, Borgen K von, Panunzi LG, Martínez-Cruz J, Valdez-Salazar HA, et al. Gene expression profiling of transcription factors of *Helicobacter pylori* under different environmental conditions. *Front Microbiol*. 2017;8(APR):1–12.
26. González A, Casado J, Chueca E, Salillas S, Velázquez-Campoy A, Angarica VE, et al. Repurposing dihydropyridines for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Pharmaceutics*. 2019;11(12).
27. Landry JJM, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, et al. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 Genes, Genomes, Genet*. 2013;3(8):1213–24.
28. Verhoeckx K, López-Expósito, Ivan Cotter P, Lea T, Charlotte K, Mackie A, Requena T, et al. The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health In Vitro and Ex Vivo Models. In.
29. Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, et al. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: Evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci*. 1994;107(1):213–25.
30. Invitrogen. PrestoBlue® Cell Viability Reagent Product Information Sheet. 2019;0–1. Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018370-PrestoBlueCellViabilityReagent-PI.pdf>
31. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. *Assay Guid Man [Internet]*. 2004;(Md):1–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>
32. Tamargo J, Le Heuzey JY, Mabo P. Narrow therapeutic index drugs: A clinical pharmacological consideration to flecainide. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015;71(5):549–67.
33. Sarver JG, Trendel JA, Bearss NR, Wang L, Luniwal A, Erhardt PW, et al. Early stage efficacy and toxicology screening for antibiotics and enzyme inhibitors. *J Biomol Screen [Internet]*. 2012;17(5):673–82. Available from: <https://doi.org/10.1177/1087057112438769>
34. Salillas S, Alías M, Michel V, Mahía A, Lucía A, Rodrigues L, et al. Design, Synthesis, and Efficacy Testing of Nitroethylene- and 7-Nitrobenzoxadiazol-Based Flavodoxin Inhibitors against *Helicobacter pylori* Drug-Resistant Clinical Strains and in *Helicobacter pylori*-Infected Mice. *J Med Chem*. 2019;62(13):6102–15.
35. Panteleev P V., Bolosov IA, Balandin S V., Ovchinnikova T V. Design of antimicrobial peptide arenicin analogs with improved therapeutic indices. *J Pept Sci*. 2015;21(2):105–13.
36. Jiang Z, Vasil AI, Vasil ML, Hodges RS. “Specificity determinants” improve therapeutic indices of two antimicrobial peptides piscidin 1 and dermaseptin S4 against the gram-negative pathogens *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmaceutics*. 2014;7(4):366–91.